



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**“ Estrategias alternativas para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias ESKAPE”**

Autor: Pascual Lorén, María

Fecha: Junio 2019

Tutor: Jiménez Cid, Victor

## **INDICE:**

<b>1.</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>pag 2</b>
<b>2.</b>	<b>Introducción y antecedentes.....</b>	<b>pag 2</b>
	2.1 Bacterias multirresistentes, un problema para la salud pública	
	2.2 Estrategias alternativas de tratamiento	
<b>3.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>pag 9</b>
<b>4.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>pag 9</b>
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>pag 9</b>
	5.1 Estrategias anti-virulencia .....	pag 9
	5.1.1 Inactivación de toxinas.	
	5.1.2 Inhibición de sistemas de secreción.	
	5.1.3 Inhibición del sistema “Quorum sensing”.	
	5.2 Estrategias anti-biofilm .....	pag 13
	5.3 Bacteriófagos y Terapia fágica .....	pag 15
<b>6.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>pag 18</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>pag 19</b>

## RESUMEN:

Las bacterias “ESKAPE” han surgido en las últimas décadas debido al consumo abusivo e inadecuado de antibióticos, entre otras causas. La resistencia de estas bacterias a la mayoría de los antibióticos disponibles supone un gran problema para la salud pública. Esto ha llevado al desarrollo de otras estrategias alternativas como las estrategias anti-virulencia, la terapia anti-biofilm y los bacteriófagos para el tratamiento de las infecciones producidas por estas bacterias. En esta revisión se describen estas estrategias, sus ventajas y limitaciones, así como sus potenciales aplicaciones clínicas.

## SUMMARY:

“ESKAPE” bacteria have surged in the last decades due to the abuse and incorrect use of antibiotics, among other causes. The resistance of this bacteria against most of the available antibiotics is a big problem for public health. This situation has led to the development of alternative strategies such as anti-virulence strategies, anti-biofilm therapy and phage therapy for infection treatment. In this review these alternatives are described, with their advantages and limitations, and their potential clinical applications.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES:

Desde los comienzos de la microbiología se observó que algunas bacterias poseían unas características que les hacían resistentes a determinados principios activos. Esto es lo que se conoce como resistencia intrínseca. Sin embargo, la resistencia a antibióticos más importante es la resistencia adquirida, mediante la cual una bacteria previamente sensible a un antibiótico puede desarrollar mecanismos adaptativos que le permitan sobrevivir en su presencia [1]. Ante la aparición de una resistencia el protocolo habitual suele ser emplear otro antibiótico de segunda línea o bien una combinación de varios antibióticos. El problema surge cuando aparecen cepas bacterianas resistentes a todos los antibióticos disponibles. Por lo tanto, es necesario plantear el desarrollo de otras alternativas no antibióticas para el tratamiento de las infecciones producidas por estas bacterias multirresistentes.

En este trabajo he decidido centrarme en las bacterias pertenecientes al grupo “ESKAPE”, un grupo formado por seis patógenos nosocomiales que presentan multirresistencia a antibióticos y virulencia: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp [3]. Estos patógenos están incluidos en la lista publicada por la OMS que contiene las doce bacterias para las cuales es urgente el desarrollo de nuevos antibióticos ya que las infecciones que producen son muy graves y las alternativas para su tratamiento son escasas [2].

Entre los principales mecanismos de resistencia de estas bacterias multirresistentes se encuentran:

- i) La expulsión del fármaco mediante bombas de eflujo. Este tipo de bombas expulsa al exterior bacteriano una gran variedad de antibióticos y otras moléculas como detergentes o biocidas usados frecuentemente en la práctica clínica. Son esenciales para la supervivencia de la bacteria, sobre todo en presencia de sustancias tóxicas [3].
- ii) Evasión del antibiótico mediante la modificación de su diana [3].

- iii) Modificación enzimática del antibiótico o destrucción de este. Muchas bacterias producen enzimas, como las  $\beta$ -lactamasas, que modifican irreversiblemente e inactivan el antibiótico [3].
- iv) La disminución de la permeabilidad de la pared celular, impidiendo que el fármaco alcance concentraciones intracelulares efectivas. Esto se produce en ocasiones por la pérdida de porinas, unas proteínas que forman canales en la membrana externa de las bacterias permitiendo el paso de sustancias hidrófilas, entre ellas los antibióticos. Este mecanismo de resistencia solo está presente en las bacterias gram-negativas [3].
- v) Formación de biofilms. La matriz extracelular del biofilm aporta a las bacterias que lo forman una protección mecánica y bioquímica. Bajo estas condiciones es muy difícil eliminar las bacterias usando antibióticos convencionales [3]

La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones y/o por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. En el primer caso, la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético móvil como integrones y transposones [31].

## **2.1 Bacterias multirresistentes, un problema para la salud pública.**

Estas bacterias ESKAPE producen infecciones nosocomiales que suponen una gran amenaza para la salud global. El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) ha estimado que alrededor de 25.000 personas mueren al año en la Unión Europea por infecciones debidas a esta resistencia a antibióticos, lo que supone una pérdida de alrededor de 1.500 millones de euros en servicios sanitarios y en productividad al año [4].

Para evitar la aparición y el desarrollo de estas bacterias multirresistentes es necesario establecer unas estrategias locales, nacionales e internacionales. Con este fin, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el ECDC lo ha considerado como una prioridad y en 2015 la OMS adoptó un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antibióticos. Entre sus objetivos se encuentran: (i) mejorar la concienciación y la comprensión de los ciudadanos acerca de la resistencia a los antibióticos; (ii) reducir la incidencia de infecciones con medidas de higiene y saneamiento eficaces; (iii) promover el correcto uso de los antibióticos y (iv) reforzar la base científica a través de la investigación [5].

El abuso en el consumo de antibióticos es una de las principales causas de la aparición de resistencias [4]. En particular el uso extrahospitalario que se hace de los mismos (en España es el 91% del total) [6]. Además, parte de estos se dispensan sin prescripción médica, principalmente penicilinas como la amoxicilina y la amoxicilina/ácido clavulánico. Por otra parte, esta automedicación también tiene lugar como consecuencia de los botiquines caseros, ya que se estima que aproximadamente la mitad de los hogares españoles tienen antibióticos [6].

Tan importante como conocer la cantidad de antibióticos consumidos es conocer la manera en la que se están utilizando. En la mayoría de los casos, la prescripción de los antibióticos se realiza de manera empírica, siendo en muchas ocasiones incorrecta. En el diagnóstico, el médico debe conocer cuál es el agente causal más probable y su susceptibilidad

a los antibióticos. Por otra parte, debe valorar cual es el antimicrobiano más adecuado para cada paciente [6]. La correcta prescripción de antibióticos en la Atención Primaria es el primer paso para un uso adecuado de los mismos y, por lo tanto, para reducir la aparición de las bacterias multirresistentes. Según un estudio realizado en Cataluña, de todas las enfermedades infecciosas registradas, solo el 30,1% de los casos requería tratamiento antibiótico según las guías terapéuticas [7]. La causa más común del uso inapropiado es la prescripción innecesaria de estos medicamentos. Este incumplimiento terapéutico es un factor que puede tener repercusiones muy graves no solo a nivel del individuo, sino que también favorece la selección de cepas resistentes difíciles de erradicar y que, posteriormente, pueden transferirse a la comunidad. Esta transmisión puede producirse a través de las aguas residuales urbanas procedentes de las plantas depuradoras ya que estas contienen genes de resistencia bacteriana a varias familias de antibióticos [8]. Otra forma de transmisión de resistencias a la comunidad es mediante el uso de antibióticos en ganadería y agricultura, de forma que nos llegan a través de la cadena alimentaria [4].

## 2.2 Estrategias alternativas de tratamiento

En la actualidad están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de discapacidad y muerte, y produciendo una prolongación de la enfermedad. Este problema ha sido paliado hasta el momento por el continuo desarrollo de nuevas moléculas de antibióticos. Sin embargo, el desarrollo de nuevos antibióticos se ha enlentecido en las últimas décadas debido al número limitado de dianas disponibles en la bacteria y la dificultad a la hora de desarrollar moléculas que no sean tóxicas para el huésped [9]. Por otra parte, para que un fármaco sea introducido al mercado debe pasar ensayos clínicos y controles de seguridad cada vez más estrictos [11]. Además, el beneficio económico que estos producen es menor que el de fármacos empleados en otras enfermedades crónicas por lo que algunas industrias farmacéuticas no lo consideran rentable [9].

El incremento de la resistencia bacteriana junto a las dificultades en el desarrollo de nuevos antibióticos ha hecho necesaria la aparición de estrategias alternativas no-antibióticas para el tratamiento de estas infecciones [10]. Muchas de ellas sirven como un tratamiento adyuvante para prolongar la vida de los antibióticos disponibles en la actualidad y aumentar su eficacia [11]. Algunas de las estrategias existentes o que se encuentran actualmente en desarrollo son: (i) las estrategias anti-virulencia, (ii) estrategias anti-biofilm, (iii) la terapia con bacteriofagos [11].

### i) Las estrategias anti-virulencia:

Estas estrategias proponen una interacción con los factores de virulencia, permitiendo que el sistema inmune del huésped luche de manera más fácil contra las bacterias [11]. Los factores de virulencia son moléculas que permiten a las bacterias resistir a su eliminación por el huésped, invadir y acceder a tejidos más profundos dañando así las células del huésped [12]. Estos factores de virulencia son producidos durante el proceso infeccioso y pueden no ser necesarios para la viabilidad de la bacteria, pero sí para su patogenicidad [11]. Podemos clasificar los fármacos anti-virulencia según su mecanismo de acción: Inactivadores de toxinas, inhibidores de los sistemas de secreción e inhibidores del sistema QS.

Las toxinas son unos factores de virulencia expresados por la bacteria capaces de matar a la célula huésped y modificar diferentes sistemas de las células eucariotas. Por ejemplo, la bacteria *E.coli* presenta unas toxinas tipo-Shiga que inhiben la síntesis de proteínas por la célula. La toxina-alpha de *S.aureus* forma poros en las membranas de la célula huésped, llevando a la lisis celular [11]. Estas toxinas son producidas en el citoplasma de la bacteria, por lo que primero deben ser transportadas al exterior de la bacteria para poder así acceder a la célula del huésped. Para ello, la bacteria presenta unos complejos sistemas de secreción, los cuales también son una diana para algunos de estos fármacos [11].

Las bacterias secretan proteínas a través de la membrana citoplasmática por dos vías: la vía Sec (para proteínas sin plegar) y la vía Tat (para proteínas plegadas). En las bacterias gram-negativas, las proteínas secretadas al periplasma por estas vías pueden permanecer en esos compartimentos o pueden ser transportadas a través de la pared celular al exterior con ayuda de otros sistemas de secreción. Entre ellos, se ha visto que los sistemas tipo II y tipo III están muy implicados en la virulencia de la bacteria [11].

El sistema de secreción de tipo II (T2SS) está presente en muchas bacterias gram-negativas, patógenas o no, para expulsar proteínas al exterior de la bacteria. Este sistema de secreción es un complejo multiproteico, compuesto por 12 o más subunidades, dependiendo de la especie. Las proteínas secretadas primero alcanzan el periplasma mediante las vías Sec o Tat. Posteriormente, el T2SS transporta las proteínas a través de la membrana externa mediante una secretina (*fig 1*)[13]. Algunas bacterias emplean este sistema para transportar factores de virulencia fuera de la célula. Por ejemplo, la exotoxina A de *P.aeruginosa* que bloquea la síntesis de proteínas en las células huésped es secretada por el T2SS. Este sistema de secreción no solo está implicado en la virulencia, también es empleado en el ensamblaje de orgánulos como los flagelos y pilis [13].

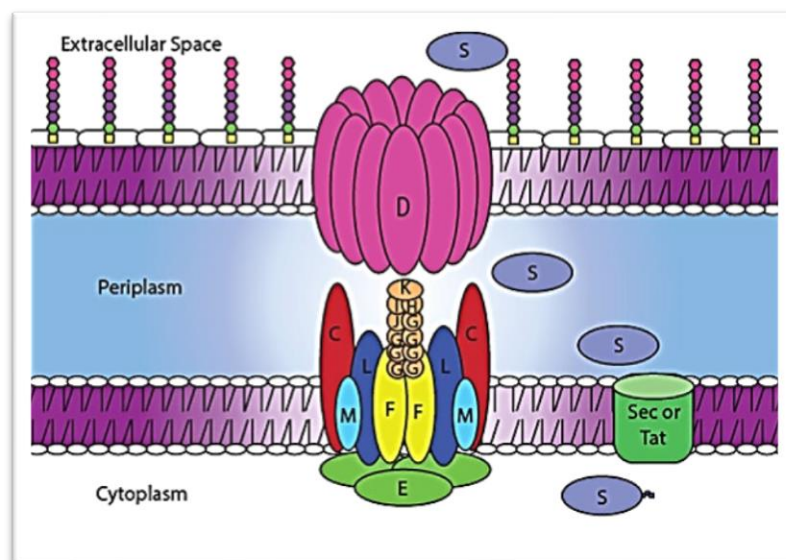


Figura 1: Estructura del T2SS y secreción de las proteínas al exterior celular.[32]

Los sistemas de secreción tipo III (T3SS) se encuentran en un gran número de bacterias gram-negativas, entre ellas *P.aeruginosa* y *E.coli* [11]. Este sistema está formado por un mínimo de 14 proteínas que se ensamblan en forma de estructuras complejas, conocidas como “inyectisomas” (fig 2). Estos son capaces de introducir proteínas efectoras directamente desde el citoplasma bacteriano al interior de la célula eucariota, produciendo cambios en su membrana y orgánulos, y pudiendo llevar a la muerte de la célula [14]. Por ello, la secreción de estos efectores por el T3SS a las células del huésped es esencial para la virulencia de muchos patógenos [11].

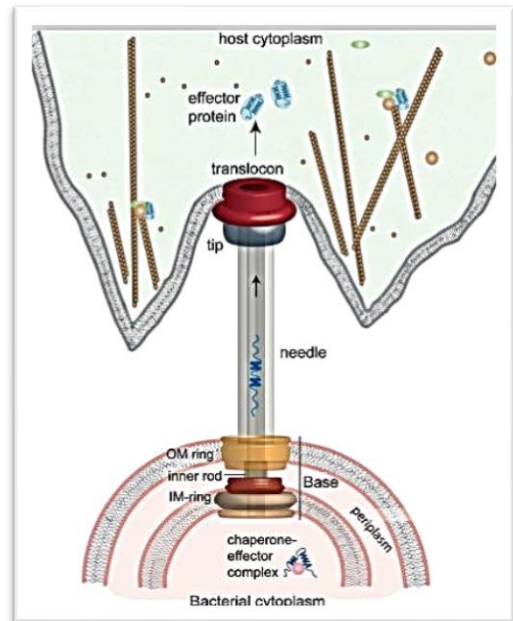


figura 2: Estructura del inyectisoma en contacto con la célula huésped. [33]

Otra estrategia anti-virulencia consiste en inhibir unos sistemas de señalización llamados “Quorum sensing” que presentan la mayoría de las bacterias y de los que se hablará más adelante ya que están relacionados con la formación de los biofilms. Estos sistemas de señalización están también implicados en la expresión de genes que codifican algunos factores de virulencia [12].

## ii) Inhibición de la formación de biofilms:

Los biofilms son estructuras muy complejas formadas por un gran número de células y que normalmente comprenden distintas especies bacterianas. Los patógenos que se encuentran más frecuentemente formando biofilms son *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii* y *K.pneumoniae* [12]. Las bacterias que forman el biofilm se encuentran embebidas en una matriz formada por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que presentan adherencia entre sí y con la superficie. Los biofilms pueden formarse tanto en superficies inertes (catéteres, prótesis, implantes dentales...) como en nuestro organismo (tejido epitelial, superficies mucosas y dientes), siendo una fuente de infección. En este estado de crecimiento la bacteria se vuelve más resistente al antibiótico debido a que estos microorganismos presentan una alta tasa de mutación e intercambio de genes de resistencia. Además, la propia matriz extracelular del biofilm puede impedir la entrada del antibiótico, lo cual hace muy difícil su erradicación [15].

Para la formación del biofilm, primero se produce la adhesión de las células libres implicadas a la superficie infectada y después estas bacterias se agregan formando microcolonias. Tras la adhesión, se sintetizan los EPS, incluyendo proteínas, glicoproteínas, glicolípidos, y DNA extracelular. En los biofilms maduros, las microcolonias se diferencian, adquiriendo unas características diferentes a las de las bacterias libres (bacterias planctónicas) que lo forman. Finalmente, algunas bacterias del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies [16]. (fig 3)

El proceso de formación de los biofilms en muchas ocasiones esta mediado por vías de “Quorum sensing” (QS). La percepción del cuórum o “quorum sensing” es un mecanismo basado en la densidad de población que poseen las bacterias para comunicarse entre ellas y poder así actuar de manera coordinada en una infección. Está basado en una secuencia de eventos que consisten en la producción de moléculas señalizadoras de bajo peso molecular, los autoinductores, que son secretadas al medio externo. Cuando se acumula en el medio una suficiente cantidad del autoinductor este activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos. En bacterias gram-negativas el autoinductor es principalmente una acil-homoserina lactona (Acil-HSL), mientras que en bacterias gram-positivas los autoinductores suelen ser péptidos [12]. Este sistema QS está implicado en la formación de los biofilms ya que facilita la comunicación entre las células que lo forman y desencadena la producción de la matriz [12].

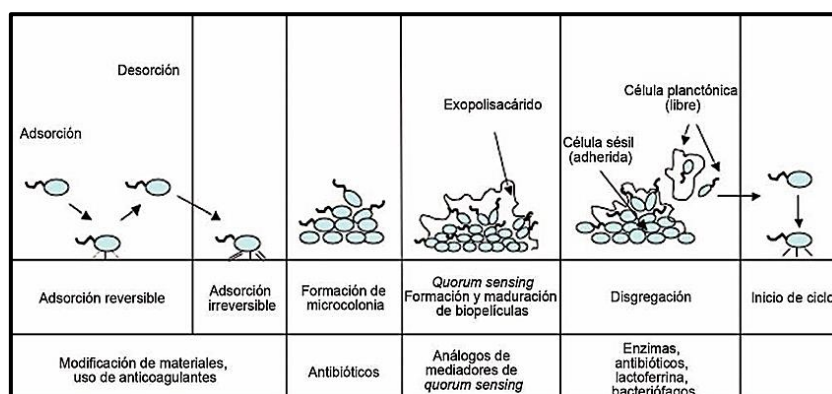


Figura 3: Fases de formación de un biofilm. Fuente [34]

### iii) Terapia fágica:

Los bacteriófagos son virus que solo infectan células bacterianas. Durante una infección lítica (*fig 4*) el fago se une al receptor de la superficie de la bacteria (una proteína o azúcar) e introduce su material genético en el interior bacteriano. Posteriormente, se transcribe, traduce y replica en el citoplasma dando lugar a nuevos fagos que salen del citoplasma mediante la lisis de la bacteria. Para ello producen unas enzimas llamadas lisinas que digieren la pared bacteriana, permitiendo la salida del profago. Una vez en el exterior, estos nuevos fagos pueden infectar a otras bacterias [18]. Los fagos virulentos solo presentan este ciclo lítico y se consideran los mejores candidatos para el desarrollo de la terapia fágica. (*Fig. 4*)

También existen en la naturaleza otro tipo de fagos, los fagos atemperados, que siguen un ciclo lisogénico [18]. Estos fagos se integran en el genoma de la célula huésped y son heredados por las células hijas formadas durante la fisión binaria de la bacteria. Sin embargo, transcurrido un tiempo y, debido a una situación de estrés o una perturbación de su ambiente, el fago lisogénico se escinde del genoma de la bacteria y entra en un ciclo lítico de infección.



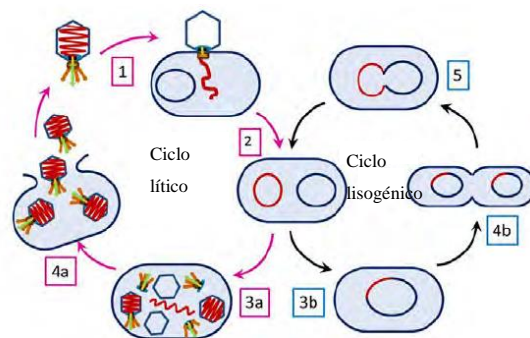


figura 4: fases del ciclo lítico y el ciclo lisogénico de un fago. Fuente: [18]

### 3. OBJETIVOS:

La finalidad de este trabajo es la realización de una revisión bibliográfica acerca el problema que supone para la salud pública el desarrollo de las bacterias resistentes a antibióticos, en particular las del grupo ESKAPE, y estudiar las nuevas alternativas presentes para el tratamiento de las infecciones causadas por dichas bacterias. Para ello se han establecido como objetivos principales:

- Exponer, de forma general, algunas de las estrategias no convencionales, existentes o en desarrollo, para el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistentes del grupo ESKAPE.
- Comparar estas estrategias, planteando las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas para ver su viabilidad.

### 4.METODOLOGIA:

Para realizar este trabajo se ha llevado a cabo un análisis bibliográfico sobre la resistencia a antibióticos tanto a nivel mundial como nacional y nuevas estrategias no antibióticas, existentes o en desarrollo para tratar estas resistencias. Para ello se ha utilizado como principal fuente de información la base de datos Pubmed, junto con otros buscadores auxiliares como Science Direct y Google Scholar. Los artículos han sido filtrados utilizando los siguientes criterios de inclusión: revisiones, artículos con una antigüedad no superior a cinco años, disponibles online de forma gratuita y publicados en inglés. Para la búsqueda de información se han empleado como palabras clave: “ESKAPE”, “Antibiotic resistance”, “antivirulence”, “biofilm”, “phage”. Se emplearon los conectores “AND”, “OR” y “NOT” junto con las palabras clave.

Por otra parte, también se ha obtenido información de artículos publicados en la página web de la Organización Mundial de la Salud en el apartado de resistencias a antibióticos y en la pagina de El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC).

### 5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

#### 5.1 Estrategias anti-virulencia:

Entre las dianas de estos fármacos anti-virulencia se encuentran las toxinas, los sistemas de secreción tipo II/III y el sistema QS.

### 5.1.1 Inactivación de toxinas:

La inactivación de toxinas durante la infección ha probado ser una forma efectiva de prevenir o aliviar los síntomas de la enfermedad. Independientemente del mecanismo de acción de la toxina, la mayoría de los proyectos que se están desarrollando para frenar los efectos de las toxinas bacterianas se centran en los anticuerpos toxina-específicos [11]. Además, estos anticuerpos antitoxinas también se han usado como terapia adyuvante junto con antibióticos para el tratamiento de algunas infecciones [11].

Un anticuerpo dirigido frente a la toxina alpha producida por *S.aureus* (MEDI4893) se está sometiendo a ensayos clínicos de fase I. Este anticuerpo neutraliza la toxina mediante dos mecanismos: previene que la toxina adquiera la conformación necesaria para que actúe produciendo la lisis celular e inhibe la unión de la toxina a su receptor [11]. Otro anticuerpo monoclonal que se encuentra en desarrollo es el Urtoxazumab, un anticuerpo de tipo G1 que está dirigido contra la subunidad B de la toxina tipo Shyga presente en las cepas de *E.coli* enterotoxigénica (ECET). Se ha visto que este anticuerpo es capaz de neutralizar la toxina in vitro y que previene la mortalidad en modelos animales con infección por ECET severa [11]. Además, en un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, se demostró que dosis de Urtoxazumab por vía intravenosa resultaban seguras y bien toleradas [20].

Aparte del empleo de anticuerpos antitoxinas como agentes anti-virulencia, algunos estudios también han remarcado la importancia del diseño de nanopartículas como los liposomas que actúan secuestrando toxinas citotóxicas tanto in vivo como in vitro. Estos liposomas artificiales están constituidos exclusivamente por lípidos naturales y, por lo tanto, no son activos frente a las bacterias, permitiendo así su uso en combinación con antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas [12].

Por último, las toxinas también pueden ser neutralizadas por péptidos antimicrobianos (AMPs) [12]. Los AMPs son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata del huésped y son producidas por protozoos, bacterias, hongos, plantas y animales. Estudios recientes sugieren que *S.aureus* produce unas exotoxinas que inician una respuesta inflamatoria en las células epiteliales del huésped y esto facilita la colonización por la bacteria. Se han diseñado algunos péptidos antimicrobianos con capacidad para inhibir la producción de exotoxinas por esta bacteria sin alterar su crecimiento, lo cual podría prevenir infecciones microbianas en mucosas producidas por este microorganismo [21].

### 5.1.2 Inhibidores de sistemas de secreción:

Como ya se ha mencionado en la introducción, los factores de virulencia son secretados por dos sistemas principalmente: el sistema de tipo II (T2SS) y el de tipo III (T3SS). En un estudio preclínico en el que se intentó identificar compuestos que inhibieran el T2SS se identificaron nueve capaces de inhibir la secreción de elastasa (un factor de virulencia) por el T2SS de *P.aeruginosa*. Además, siete de estos nueve compuestos también inhibían la secreción de fosfolipasa C en esta bacteria y la actividad proteasa de *Burkholderia pseudomallei* [22].

Por otro lado, también hay diferentes estrategias que podrían usarse para inhibir el sistema de secreción tipo T3SS. Estos se pueden clasificar en dos categorías según su mecanismo de acción: prevenir la expresión de los genes que codifican el inyectisoma o

interferir con el ensamblaje del inyectisoma [11]. A pesar de que las toxinas secretadas suelen ser muy distintas, los componentes de estos sistemas de secreción se conservan entre diferentes especies bacterianas. Debido a esto, los inhibidores de estos T3SS pueden ser activos frente a múltiples bacterias diferentes [11].

Los más estudiados son una serie de compuestos conocidos como saliciliden acilhidracidas. Se ha demostrado que la saliciliden acilhidracida IMP0007 y varios análogos tenían como diana este mecanismo de secreción, inhibiendo específicamente el T3SS en un modelo de célula mamífera infectada por *Y.pseudotuberculosis*. En un estudio realizado con INP0403 se vio que este mediaba la inhibición del T3SS en el tratamiento de infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y en el tratamiento de la tuberculosis, ya que reducía la transcripción de genes implicados en este mecanismo. Otro estudio demostró que la presencia de estos compuestos inhibía la expresión de este T3SS en *E.coli* O157:H7 y la adhesión de la bacteria a células bovinas [23]. Las saliciliden acilhidracidas han demostrado tener la capacidad de inhibir los T3SS en múltiples bacterias por lo que suponen un punto de partida prometedor para el desarrollo de fármacos anti-virulencia. Sin embargo, no se conoce cuál es exactamente su diana y la eficacia in vivo de estos compuestos no ha sido muy estudiada [23].

### 5.1.3 Inhibidores del sistema QS:

El “Quorum sensing” es un sistema de gran importancia en algunas especies patógenas. Muchos de los genes que controlan la producción de sus factores de virulencia están regulados por cascadas de señalización que se inician por la unión de los autoinductores del QS a sus receptores. Además, los sistemas QS también tienen un papel importante en la formación de biofilms. Como consecuencia de esto, los compuestos que inhiben el QS pueden funcionar bien como adyuvantes de los antimicrobianos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos sistemas también están presentes en algunas bacterias no patógenas. Por lo tanto, hay que asegurarse de que los inhibidores de estos sistemas sean específicos para bacterias patógenas [11].

Hay diferentes vías para inhibir el sistema QS:

- i) Interferir en la unión de las moléculas señalizadoras del QS (autoinductores) con sus receptores [11]. En este campo se realizó un estudio en el que se comprobó que la meta-bromo-tiolactona (mBTL), un análogo de los de los autoinductores de *P.aeruginosa*, reprime la expresión de los genes que codifican la pirociana (un factor de virulencia), previene la formación de biofilms y protege las células epiteliales pulmonares humanas frente a esta bacteria [24].
- ii) Otro método consiste en la destrucción de estas moléculas autoinductoras. Existen múltiples enzimas que son capaces de transformar las Acil-HSL y las quinolonas producidas por varias especies en moléculas sin capacidad para unirse a sus receptores de QS. [11] Un grupo de investigadores ha diseñado una lactonasa (AHLasa) que mostró tener eficacia interfiriendo en la señalización del sistema QS en *Acinetobacter baumannii*, lo que llevó a una disminución de la biomasa y del grosor de los biofilms formados por estas bacterias [25].
- iii) Por último, se puede interrumpir la producción de los autoinductores inhibiendo las enzimas que los sintetizan [11]. En un ensayo realizado con múltiples enzimas se

encontraron dos que actuaban como potentes inhibidores de las Acil-HSL sintasas en cepas bacterianas de *Burkholderia mallei* y *Yersinia pestis* [26].

Por otra parte, también existen algunos fármacos autorizados por la FDA para otras indicaciones que han demostrado eficacia como agentes antibacterianos. Se ha visto que la niclosamida, un fármaco antiparasitario, posee actividad frente a *P. aeruginosa* porque inhibe su sistema QS y la producción de factores de virulencia, reduciendo los niveles de elastasa y piocianina. También algunos anticancerígenos como el 5-Fluorouracilo que presenta actividad frente a colonias de la cepa de *P.aeruginosa* PA14 ya que impide la formación de biofilms e inhibe la producción de factores de virulencia regulados por el sistema QS. La ventaja de estos fármacos es que ya están aprobados por la FDA para otras indicaciones por lo que se dispone de muchos datos sobre su seguridad y eficacia, facilitando su introducción al mercado [35].

Las estrategias para inhibir el QS deben superar una serie de dificultades para poder convertirse en alternativas terapéuticas viables. Por ejemplo, la interferencia con los sistemas QS podría afectar al crecimiento de la bacteria, lo cual podría llevar a la aparición de resistencias por presión selectiva. Además, se ha visto que en algunos casos la interferencia con estos sistemas puede promover la virulencia de la bacteria en lugar de atenuarla. Es importante disponer de herramientas de diagnóstico que sean suficientemente sensibles para poder detectar bajas densidades celulares del patógeno causante de la infección. De esta forma, las estrategias para inhibir del QS podrían utilizarse antes de que el patógeno alcance la concentración necesaria para que se dispare su potencial patogénico [12].

Tabla 1

Estrategia	Nombre del compuesto	Bacteria diana	Mecanismo de acción
Neutralización de toxinas	Urtioxazumab	<i>E.coli</i> (ECET)	Anticuerpo de tipo G1 que está dirigido contra la subunidad B de la toxina tipo Shyga.
Neutralización de toxinas	MEDI4893	<i>S.aureus</i>	Anticuerpo dirigido frente a la $\alpha$ -toxina.
Inhibición T2SS	Compuestos 1,2,4,5,6,8 y 9	<i>P.aeruginosa</i>	Inhiben secreción de fosfolipasa C y elastasa. Mecanismo desconocido.
Inhibición T3SS	Saliciliden acilhidracidas (INP007, INP0403)	<i>Y.pseudotuberculosis</i> <i>E.coli</i> O157:H7	Reducen transcripción de genes, inhibiendo T3SS. Mecanismo desconocido.
Inhibidor sistema QS	Meta bromo tiolactona (mBTL)	<i>P.aeruginosa</i>	Inhibe liberación de piocianina e inhibe formación de biofilms.
Inhibidor sistema QS	AHLasa	<i>A.baumannii</i>	Transformación e inactivación de AHL. Disminución de la biomasa y grosor de biofilm.
Inhibidor sistema QS	Compuestos 1 y 2	<i>Burkholderia mallei</i> , <i>Yersinia pestis</i>	Inhiben la Acil-HS sintasa.

A la vista de los resultados obtenidos en múltiples estudios que evaluaban el efecto de diferentes fármacos antivirulencia, se ha hecho aparente que estos dependen mucho de la naturaleza de la diana. (tabla 1) Para maximizar la eficacia de los compuestos anti-virulencia se están planteando estrategias como dirigir estos compuestos frente a varios factores de virulencia en vez de a uno solo, lo cual podría aumentar la probabilidad de éxito. [11]

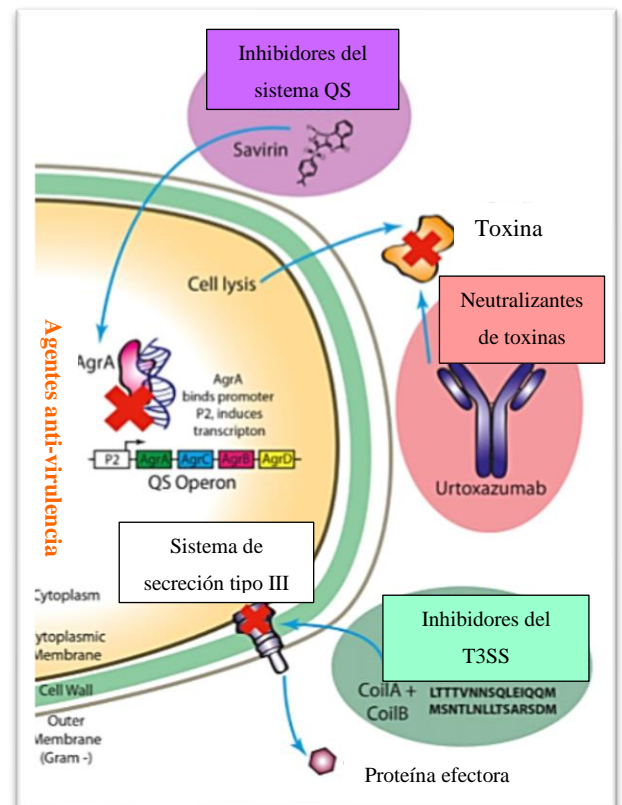
### Ventajas y limitaciones de los compuestos anti-virulencia:

Una de las ventajas que presenta la terapia anti-virulencia frente a los antibióticos convencionales es que actúa de forma específica sobre factores de virulencia que solo existen en bacterias patógenas, por lo que no afectan a la flora comensal del huésped [19]. Además, muchos investigadores creen que estas terapias tienen menos probabilidad de desarrollar resistencia en las bacterias ya que no afectan directamente a la viabilidad de la bacteria y, como consecuencia, hay una menor presión selectiva [19].

Sin embargo, estas estrategias presentan múltiples inconvenientes siendo uno de los más importantes la dificultad para determinar su efectividad ya que, a diferencia de los antibióticos convencionales, estos compuestos no detienen el crecimiento de la bacteria fuera del hospedador. Las medidas estándar de CMI (concentración mínima inhibitoria) no son válidas para estos compuestos. Por lo tanto, serían necesarios modelos animales infectados para poder ver que fármacos anti-virulencia son más efectivos. Las medidas de eficacia deben basarse en su capacidad para eliminar la infección en el animal, lo cual dificultaría la determinación de la dosis óptima [11]. Otro obstáculo en el desarrollo de estos fármacos es que no se sabe si pueden ser empleados una vez que la infección ya se ha establecido o si deben ser tomados de forma profiláctica en situaciones de alto riesgo [11].

Debido a la complejidad a la hora de evaluar la eficacia de estas estrategias y a la falta de datos disponibles no podemos lanzar conclusiones precipitadas sobre estos compuestos anti-virulencia que aún se están investigando. Actualmente, hay una gran lista de dianas y de compuestos anti-virulencia que se han identificado en estudios preclínicos. Por lo tanto, es cuestión de tiempo que estos compuestos estén disponibles para la práctica clínica.

Figura 5: Algunas de las estrategias anti-virulencia y su acción en una célula bacteriana [11]



### **5.2 Estrategias anti-biofilm:**

La terapia antibiótica no es adecuada para el control de infecciones asociadas a biofilms, sobre todo si este está formado por bacterias resistentes. El uso de elevadas concentraciones de antibióticos con el fin de perturbar el biofilm pueden llevar a una citotoxicidad y un mal pronóstico. De ahí que el desarrollo de una clase de fármacos alternativos para actuar frente a

estas infecciones sea una buena estrategia. Existen numerosos compuestos, naturales y sintéticos, que presentan esta actividad anti-biofilm. Entre estos se encuentran algunos de los compuestos anti-virulencia nombrados en el apartado anterior ya que la formación de biofilms está en muchas ocasiones mediada por el sistema Quorum sensing.

Dentro de los distintos compuestos con actividad anti-biofilm destacan los péptidos antimicrobianos (AMPs). Estos péptidos son capaces de prevenir la colonización de superficies por las bacterias, inhibir la formación de biofilms y alterar la estructura de los biofilms ya formados. Los principales mecanismos de acción anti-biofilm de estos péptidos son (*Fig 5*):

- i) Alteración o degradación del potencial de membrana de las células embebidas en el biofilm. Esta despolarización lleva a una destrucción la membrana y muerte de las células bacterianas. Por ejemplo, se han encontrado tres bacteriocinas que pueden despolarizar la membrana de las células de *S.aureus* del biofilm y provocar la liberación de ATP de su interior [16].
- ii) Interrupción de los sistemas de señalización entre las células bacterianas. Algunos péptidos pueden inhibir la transcripción de genes implicados en el sistema QS. Otros estimulan la expresión de genes implicados en la biosíntesis y la función de los pilis, incrementando la movilidad de las bacterias e inhibiendo así la formación del biofilm [16].
- iii) Degradación de los polisacáridos que forman la matriz extracelular del biofilm (EPS) y degradación del DNA extracelular (eDNA) [16].
- iv) Inhibición del sistema que desencadena la respuesta de estrés en las bacterias. Algunos péptidos actúan degradando unos nucleótidos ((p)ppGpp) que se forman en la bacteria ante situaciones de estrés y que, a pesar de que se desconoce cual es su mecanismo de acción, se ha visto que están implicados en la formación del biofilm [16]. Un ejemplo de esto es el péptido 1018 que, al disminuir los niveles de ppGpp, es capaz de prevenir la formación de biofilms e incluso destruir los ya formados por bacterias patógenas tanto gram-positivas como gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* entre otras)
- v) Inhibición de los genes que controlan la motilidad de elementos extracromosómicos e inhibición de las proteínas implicadas en el transporte y anclaje de las bacterias [16].

Debido a que los AMPs presentan múltiples dianas y sus mecanismos de acción no son específicos, tienen menos posibilidades de desarrollar resistencias. Además, pueden trabajar de forma sinérgica con muchos antibióticos de primera línea. Esto les convierte en una buena alternativa anti-biofilm frente a los antibióticos convencionales, sobre todo en ambientes de alto riesgo como los hospitales [16]. Sin embargo, la información que tenemos acerca de la interacción de los AMPs con los componentes de los biofilms es muy limitada. Para que estos compuestos sean una alternativa antibiótica viable, es necesaria una mayor investigación para comprender mejor su estructura y su mecanismo de acción con la pared bacteriana. Considerando los muchos estudios que se están llevando a cabo con diferentes AMPs frente a varios agentes infecciosos, el futuro de las formulaciones comerciales a base de péptidos parece prometedor [16].

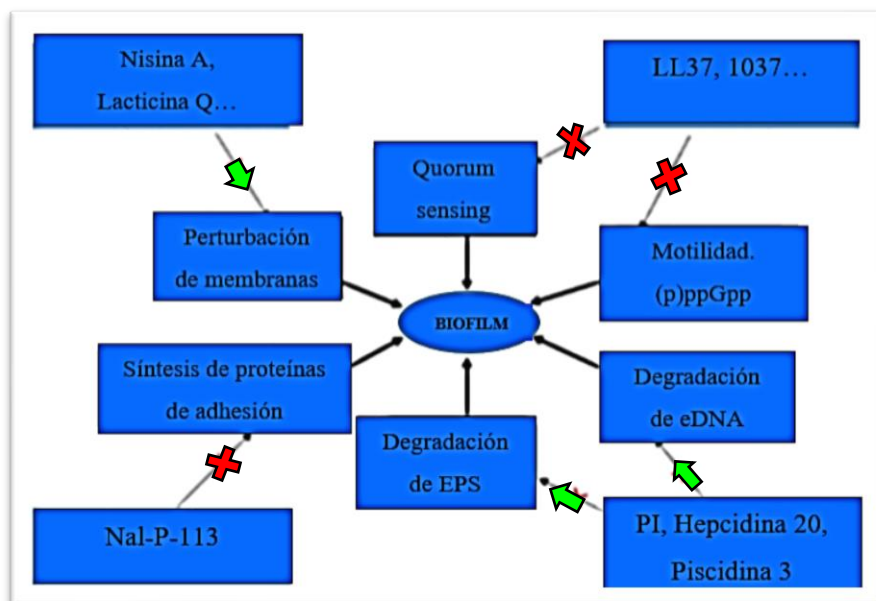


Figura 6 En la imagen se muestran algunos AMPs con acción anti-biofilm y sus principales dianas. Las cruces indican la inhibición y las flechas la acción sobre las dianas

### 5.3 Bacteriófagos y terapia fágica:

Los fagos llevan usándose muchos años para el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, en la actualidad ha aumentado el interés por este tipo de terapia debido al incremento de las resistencias ya que estos presentan muchas ventajas frente a los antibióticos convencionales:

- i) Uno de los principales problemas que presentan los antibióticos convencionales es la aparición de efectos adversos, pudiendo dañar el microbioma. Esto puede evitarse con los fagos, porque son específicos para determinadas bacterias o incluso para determinadas cepas de forma que no infectan a las células del huésped y no afectan al microbioma [27]. Sin embargo, esta especificidad también es un factor limitante. Son necesarios muchos estudios in vitro para poder ver la eficacia de un fago frente a la bacteria causante de la enfermedad. El uso de combinaciones o “cócteles” de fagos que actúan frente a diferentes bacterias o cepas podría solucionar este problema [28].
- ii) Auto-amplificación: Los fagos, al introducirse en la bacteria, se replican mediante su ciclo lítico formando nuevos fagos que pueden actuar a su vez sobre otras células bacterianas. Esto hace que pequeñas dosis sean suficientes para alcanzar el efecto deseado y que proliferen rápidamente en el interior de la célula huésped. [27]
- iii) La búsqueda de nuevos antibióticos es difícil, mientras que podemos disponer fácilmente de los fagos [29]. Por ejemplo, se han aislado fagos líticos frente a bacterias ESKAPE en aguas residuales procedentes de hospitales [27].



Varios estudios llevados a cabo in vitro han probado que los fagos son efectivos como agentes antibacterianos frente a biofilms y bacterias ESKAPE libres. En la *tabla 2* se presentan una serie de estudios realizados en modelos animales, así como ensayos clínicos y estudios de casos realizados con fagos en pacientes que sufrían infecciones por bacterias ESKAPE [27]. Estudios adicionales realizados in vivo han demostrado la eficacia y seguridad del uso de fagos para tratar infecciones bacterianas [27]. También cabe destacar que se han aislado y probado en modelos animales algunas lisinas para el control y el tratamiento de infecciones producidas por bacterias resistentes a los antibióticos convencionales. Estas lisinas presentan una alta actividad antibacteriana ya que hidrolizan los enlaces covalentes presentes en la pared bacteriana, llevando rápidamente a la lisis de la bacteria. [4].

Tabla 2

Modelo usado	Agente usado	<i>Diana ESKAPE</i>	Vía de administración	Eficacia in vivo
Modelo murino Herida infectada	Fago Siphoviridae	<i>A.baumannii</i>	Tópica	100% eliminación de la infección en 8 días
Estudio de caso: Mujer de 65 años con absceso corneal.	SATA-8508 (fago lítico comercializado)	<i>S.aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	Tópica (gotas oftálmicas y spray nasal) e i.v	Erradicación de la bacteria y estabilización de signos oculares
Serie de casos: 9 pacientes con úlcera por pie diabético	Sb-1 (Fago estafilocócico comercial)	<i>S.aureus</i>	Tópica	Curación de las heridas en una media de 7 semanas.
Serie de casos: 9 pacientes con ITU	Pyophage	<i>S.aureus</i>	Instilación por catéter suprapúbico.	Disminución de UFC (unid. formadoras de colonias) en el 67% de los pacientes
Estudio de caso: Hombre de 68 años con pancreatitis necrótica	Cóctel de 9 fagos	<i>A.baumannii</i>	Catéter percutáneo, i.v	Desaparición de la infección
Modelo murino: bacteremia	Lisina del fago C1 (mureína hidrolasa)	<i>Streptococco</i> (grupo A)	Oral	Desaparición de la bacteria en 2 h



Ya hay disponibles en algunos países preparaciones comerciales de fagos que pueden usarse frente a las bacterias ESKAPE, entre ellas “Stafal” (una preparación de fagos anti-estafilocócicos), “Sextaphage” (cóctel de fagos frente a *P.aeruginosa* y *E.coli*), “PhagoBioDerm” (un apósito polimérico impregnado por un cóctel de fagos, ciprofloxacino y otros principios activos para el tratamiento de úlceras de la piel) y “Pyophage” (preparación que contiene bacteriófagos que eliminan específicamente los agentes causantes de enfermedades entéricas e inflamatorias) [27]. El potencial clínico de estas preparaciones se está investigado más profundamente para determinar su actividad de amplio espectro frente otras cepas bacterianas in vitro, su eficacia in vivo en modelos animales, así como a través de varios estudios de casos y ensayos clínicos.

A pesar de que se han registrado en los últimos años muchos ensayos clínicos de fase I y/o fase II que demuestran la eficacia de los fagos frente a las bacterias ESKAPE, el número de ensayos completos y bien documentados es muy bajo como para lanzar conclusiones precipitadas. Además, el bajo número de pacientes que participaban en estos ensayos han limitado mucho los resultados [27].

La terapia fágica, aunque parece prometedora, también presenta una serie de limitaciones:

- i) Los fagos pueden actuar como vectores para la transmisión horizontal de genes entre las bacterias, entre ellos genes que codifican factores de virulencia o genes de resistencia, lo cual llevaría a un aumento de la resistencia del microorganismo. Es muy importante la caracterización genómica del fago para determinar si es seguro [27].
- ii) Otra de las limitaciones que presenta esta estrategia es la estabilidad de los fagos y su administración adecuada para que alcancen el lugar de acción. Los fagos son virus que pueden ser reconocidos por el sistema inmune como algo extraño y tienden a ser destruidos. Parece ser que la administración parenteral de fagos da lugar al desarrollo de anticuerpos. Sin embargo, no se ha demostrado si se generan anticuerpos cuando se utiliza la vía oral o tópica para la curación con fagos, y se ignora cual es el tiempo de permanencia de tales anticuerpos en el torrente sanguíneo [29].
- iii) El desarrollo de resistencias bacterianas frente a los fagos. Estas resistencias podrían evitarse usando “cócteles” de fagos. Además, en ocasiones los fagos pueden evolucionar para infectar a la bacteria resistente [27].

Para superar estas limitaciones, los fagos pueden combinarse con antibióticos ya que estos presentan una acción sinérgica, aumentando la efectividad del fago y de la bacteria. [27]. Avances tecnológicos recientes en este campo han abierto la posibilidad de customizar los bacteriófagos para mejorar sus características, en particular: (i) aumentar su capacidad para penetrar en los biofilms; (ii) incrementar su potencia y efectividad; (iii) adaptar su espectro de actuación para infecciones causadas por varias bacterias o cepas bacterianas; (iv) hacerlos más estables y específicos [30].

Las tres estrategias presentadas en esta revisión presentan tanto ventajas como inconvenientes. Lo que está claro es que las tres parecen una buena solución para frenar el desarrollo de las resistencias, bien debido a su especificidad (la terapia fágica) o bien debido a que no destruyen a la bacteria ni alteran su crecimiento (las estrategias anti-virulencia), lo cual lleva a una menor presión selectiva. A mi parecer, el principal problema que presentan la mayoría de estas estrategias es que en muchos de los casos se desconoce cuál es su mecanismo exacto de actuación, así como sus características farmacocinéticas y su seguridad en el paciente. Dentro de las estrategias antivirulencia, parece que la inhibición del sistema QS es la que se encuentra en un estado más avanzado de desarrollo. Esta presenta la ventaja de que además de su acción sobre la virulencia de la bacteria, también interfiere en la formación de los biofilms. Por otra parte, la estrategia sobre la que se tiene más información es la terapia fágica ya que esta es la que más tiempo lleva utilizándose. Por eso, considero de vital importancia el desarrollo de más estudios de farmacocinética para que estos compuestos puedan administrarse sin que sean destruidos por el sistema inmune, así como estudios de toxicidad para asegurar la seguridad de estos compuestos.

### **CONCLUSIONES:**

1. Para combatir las infecciones bacterianas, es necesario aumentar la vida útil de nuestro repertorio actual de antibióticos. Para ello, se deben tomar una serie de medidas: reducir el número de prescripciones de antibióticos que se dan para enfermedades no infecciosas, educar a la población para el correcto uso de los mismos y el empleo de adyuvantes de antibióticos, entre otras.
2. El uso de tratamientos alternativos ayudaría a disminuir el consumo de antibióticos y por lo tanto, alargaría el tiempo de aparición de las resistencias en algunas especies. A parte, estos tratamientos podrían emplearse en infecciones producidas por bacterias que ya no responden a ningún antibiótico.
3. Hay una gran lista de compuestos que se encuentran en desarrollo preclínico y clínico que se presentan como buenos candidatos para su uso frente a estas bacterias multirresistentes.
4. Estos compuestos en desarrollo presentan todavía una serie de limitaciones. Algunas de las limitaciones más comúnmente descritas son la estabilidad y la toxicidad del agente terapéutico, su llegada al lugar de acción o el desarrollo de la respuesta inmune por el huésped frente a estos compuestos.
5. Son necesarios más estudios para poder desarrollar y modificar estos nuevos agentes terapéuticos con el fin de vencer estas limitaciones.
6. Es necesario invertir tiempo y dinero en el desarrollo de estos estudios (de eficacia, toxicidad, farmacocinéticos...) para que estos compuestos puedan llegar a la práctica clínica.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey R.B, Carmeli Y, Falagas M.E, Giske C.G, Harbarth S, Hindler J.F, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18:268–281
2. Tacconelli E, Magrini N. World health organisation. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, Discovery, and development of new antibiotics. 2017. [online] Disponible en: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
3. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International.* 2016; 1:8
4. Rios A, Moutinho C, Pinto F, Del Fiol F, Jozala A, Chaud M, Vila M, Teixeira J, Balcão V. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiol Res.* 2016; 191(1):51-80.
5. Organización Mundial de la Salud, Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, 2015. [Online] Disponible en: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/es/>
6. Lázaro E., Oteo J. Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España. *Inf Ter Sist Nac Salud.* 2006; 30:10-19.
7. Caminal J, Rovira J. Antibiotic prescription in primary health care: clinical and economic perspectives. *Eur J Public Health.* 2005; 15(3):276-281
8. Pärnänen K, Narciso-da-Rocha C, Kneis D, Berendonk. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci Adv.* 2019; 5(3)
9. Karmakar P, Gaitonde V. Promising Recent Strategies with Potential Clinical Translational Value to Combat Antibacterial Resistant Surge. *Medicines.* 2019; 6:21.
10. Czaplowski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti V, Foster S, Gilmore B, Hancock R, Harper D, Henderson I, Hilpert K, Jones B, Kadioglu A, Knowles D, Ólafsdóttir S, Payne D, Projan S, Shaunak S, Silverman J, Thomas C, Trust T, Warn P, Rex J. Alternatives to antibiotics: a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 239–51
11. Gill E, Franco O, Hancock R. Antibiotic Adjuvants: Diverse Strategies for Controlling Drug-Resistant Pathogens. *Chem Biol Drug Des.* 2015; 85:56–78.
12. Martínez O, Cardoso, Meira S, Franco O. Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9:74.
13. Korotkov K, Sandkvist M, Wim G. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Hol Nat Rev Microbiol.* 2012; 10(5): 336–351.
14. Notti R, Stebbins C. The Structure and Function of Type III Secretion Systems. *Microbiol spec.* 2016; 4 (1):10.
15. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews | Microbiology.* 2016; 14:563-575.
16. Yasir M, Duncan M, Willcox P, Dutta D. Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials.* 2018; 11:1-15.
17. Jimenez P, Koch G, Thompson J, Xavier K, Cool R, Quax W. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76:46–65.
18. Kortright K, Chan B, Koff J, Turner P. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell host and microbe.* 2019; 25(2): 219-232
19. Totsika M. Benefits and Challenges of Antivirulence Antimicrobials at the Dawn of the Post-Antibiotic Era. *Drug Delivery Letters.* 2016; 6(1):30-37
20. Lopez E, Contrini M, Glatstein E, Gonzalez S, Sontoro R, Allende D, Ezcurra G. Safety and pharmacokinetics of urtoxazumab, a humanized monoclonal antibody, against Shiga-like toxin 2 in healthy adults and in pediatric patients infected with shiga-like toxin producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:239–243

21. Merriman J, Nemeth K, Schlievert P. Novel Antimicrobial Peptides That Inhibit Gram Positive Bacterial Exotoxin Synthesis. *Plos one*. 2014; 9(4) :1-7
22. Moir D, Di M, Wong E, Moore R, Schweizer H, Wood D, Bowlin T. Development and Application of a cellular, gain-of-Signal, bioluminescent reporter screen for inhibitors of type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Biomolecular screening*. 2011; 16(7):694-705.
23. Keyser P, Elofsson M, Rosell S, Wolf-Watz S. Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *Journal of internal medicine*. 2008; 264:17-29
24. O'Loughlin C, Miller L, Siryaporn A, Drescher K, Semmelhack M, Bassler B. A quorumsensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:17981–17986.
25. Chow JY, Yang Y, Tay SB, Chua KL, Ye WS. Disruption of Biofilm Formation by the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii* Using Engineered Quorum-Quenching Lactonases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58 (3) :1802–1805.
26. Christensen Q, Grove T, Booker S, Greenberg P. A high-throughput screen for quorum-sensing inhibitors that target acyl-homoserine lactone synthases. *Proc Natl Acad Sci*. 2013; 110(34): 13815–13820.
27. Mulani S, Kamble E, Kumkar S, Tawre M, Pardesi K. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol*. 2019; 10: 539.
28. Chan B, Abedon S, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol*. 2013; 8:769–783.
29. García E, López R. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap*. 2002; 15 (4): 306-312.
30. Ruiz J, Castro I, Calabuig E, Salavert M. Non-antibiotic treatment for infectious diseases. *Rev Esp Quimioter*. 2017;30 (1): 68.
31. Fernández F, López J, Ponce L, Machado C. Resistencia bacteriana. *Rev Cub Med Mil*. 2013; 8 (1):1-17.
32. Waack U, Johnson T, Chedid K, Xi C, Simmons L, Mobley H, Sandkvist M. Targeting the Type II Secretion System: Development, Optimization, and Validation of a High-Throughput Screen for the Identification of Small Molecule Inhibitors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7:380
33. Chatterjee S, Chaudhury S, McShan A, Kaur K, De Guzman R. Structure and Biophysics of Type III Secretion in Bacteria. *Biochemistry*. 2013; 52(15): 2508–2517.
34. Castrillon L. Importance of biofilms in medical practice. *Derm Rev Mex*. 2010; 54(1):14-24
35. Miró-Canturri A, Ayerbe-Algaba R, Smani Y. Drug Repurposing for the Treatment of Bacterial and Fungal Infections. *Front Microbiol*. 2019 ;10(41):9